

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 太田 嘉則

広い多様性をもつ微生物には、1~10 原子の塩素を含むポリ塩化ビフェニル(PCB)のような人為起源の難分解性芳香属化合物を分解するものがあり、その分解遺伝子群は共通の祖先から進化したことが示唆されている。一方、特殊な環境で生存可能な微生物は、その環境に適応するために独自の進化過程をたどったことが期待される。そこで、特殊環境に生育可能な微生物の中で PCB 分解能をもつものを調べれば、これまでと異なる特徴を持つ分解遺伝子群や進化的環境適応に関する新知見が得られる可能性がある。本論文は、このような観点から、アルカリ性及び有機溶媒に耐性で PCB 分解能をもつ微生物を探索し、その分解系遺伝子に関する検討結果をまとめたもので、6 章から成っている。

第1章では、有機溶媒耐性の PCB 分解菌の探索及び解析について述べられている。20%容の有機溶媒を含み 1%ビフェニルを単一炭素源とする培地で生育できる微生物として、*Pseudomonas putida* CE2010 株などを分離した。CE2010 株は、シクロヘキサン、ヘキサン、シクロオクタンに耐性で、これまで得られた芳香属分解菌中でもっとも高い有機溶媒耐性能をもっていた。CE2010 株はトリクロロ体 PCB をほぼ完全に分解し、テトラクロロ体にも分解能を示した。

第2章では、アルカリ耐性 PCB 分解菌の探索及びその解析について述べられている。pH10 以上で生育する PCB 分解菌は得られなかったが、pH9 まででは *Alcaligenes denitrificans* A41 株、*Rhodococcus* 属 HA99 株および K37 株などが得られた。これらはトリクロロ体をほぼ完全に分解し、テトラクロロ体にも分解能を示した。

第3章では、有機溶媒耐性の CE2010 株のビフェニル分解経路遺伝子の取得とその解析について述べられている。CE2010 株から、メタ開裂酵素遺伝子をクローニングし塩基配列を決定したところ、得られた遺伝子はトルエン資化菌 *P. putida* F1 株の *todE* 及び *cmtC* と 100%一致していた。これらの遺伝子を含むトルエン分解経路とクメン分解経路の遺伝子群について詳細に調べたところ、この領域において CE2010 株と F1 株は同一であるという結果を得た。F1 株はビフェニルを単一炭素源として生育できず、それは F1 株の *tod* 遺伝子群産物がビフェニルを 2-hydroxy-6-oxo-6-phenylhexa-2,4,-dienoic acid (HPDA)まで変換しても、次の *todE* 遺伝子産物がこれを基質としないためであることが知られているので、CE2010 株では何らかの酵素が HPDA を分解していると考えられる。CE2010 株から HPDA 分解酵素を精製し、N 末端アミノ酸配列を決定したところ、F1 株の *cmtE* 遺伝子産物と完全に一致していた。CE2010 株の *cmtE* 遺伝子を *tet* 遺伝子で破壊するとビフェニル資化能は失われた。また *tod* 及び *cmt operon* の破壊はいずれもビフェニル資化能を失わせるが、*cmt operon* 破壊株に *cmtE* 遺伝子のみを形質転換すればビフェニルの資

化能は回復した。即ち、CE2010 株は *tod* operon と *cmtE* の協働でビフェニルを資化している。

第 4 章では、第 3 章で明らかにした CE2010 株の PCB 分解に必要な *cmtE* がなぜこの株で発現しているかについて述べられている。CE2010 株の *cmt* 及び *tod* operon の全塩基配列を決定した結果、*cmt* promoter 領域で 1 塩基が F1 株と異なることを発見した。この領域は転写抑制因子 CymR の結合領域で、塩基置換はそのヘアピン構造を不安定化すると推定された。精製 CymR タンパク質による gel shift assay でも親和性の低下が示された。また、*cmt* operon の promoter 領域を F1 株由来に置換すると、CE2010 株のビフェニル資化能は失われた。即ち、1 塩基置換は脱抑制により HPDA 分解酵素を生産させ、ビフェニル資化を可能にしている。

第 5 章では、第 2 章で取得したアルカリ耐性の *Alcaligenes denitrificans* A41 株の PCB 分解経路遺伝子群のクローニングと塩基配列解析について述べられている。予想される 15 の open reading frame は、各遺伝子ユニットの配置は異なるが、既知の *bph* 遺伝子群とそれぞれ相同性が認められた。

第 6 章は、全体の総括とこれからの研究の展望が述べられている。

以上、本論文は極限環境に耐性な微生物の中から PCB 分解能の優れたものを探索取得し、その特性と遺伝子構造・発現制御について新たな知見を明らかにしたものであり、学術上・応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。